

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 04-031762

(43)Date of publication of application : 03.02.1992

(51)Int.Cl.

G01N 33/53
C07K 15/14
C12P 21/08
G01N 33/577
// C12N 5/20
C12N 15/06
(C12P 21/08
C12R 1:91)

(21)Application number : 02-139337

(71)Applicant : DAINIPPON PHARMACEUT CO
LTD

(22)Date of filing : 28.05.1990

(72)Inventor : TANAKA KOSEI
NISHIMURA SHINZO
ASAYAMA KUMIKO
SUNAHARA NORIYUKI

(54) ANTI-FATTY-ACID BONDED PROTEIN ANTIBODY AND ITS APPLICATION

(57)Abstract:

PURPOSE: To recognize fatty-acid bonded protein obtained from human myocardium tissue (called hh-FABP hereinafter) by using anti-hh-FABP antibody standard material.

CONSTITUTION: A polyclonal antibody can be produced by immunizing an animal such as a mouse with hh-FABP. A monoclonal antibody can be manufactured by performing the cell fusion of the spleen cell of such immunized animal in and a myeloma cell by a Milstein's method, performing cloning, selecting a hybridoma and performing the culture of the hybridoma. As label material, enzyme such as peroxydase and B-galactosydase, radioactive substance such as 125 I and flourescence material such as fluorescein isothyocyanate are listed. The bonding of the antibody, the label material and the like is performed by utilizing a carboxyl group, an amino group, an SH group, an OH group or the like.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of

rejection]

[Kind of final disposal of application other than
the examiner's decision of rejection or
application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平4-31762

⑬ Int.Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成4年(1992)2月3日

G 01 N 33/53
C 07 K 15/14
C 12 P 21/08
G 01 N 33/577
C 12 N 5/20
15/06
(C 12 P 21/08
C 12 R 1:91)

D 7906-2 J
7731-4 H
8214-4 B
B 9015-2 J

7236-4 B C 12 N 5/00
8717-4 B 15/00

B
C

審査請求 未請求 請求項の数 5 (全6頁)

⑮ 発明の名称 抗脂肪酸結合性蛋白抗体およびその応用

⑯ 特 願 平2-139337

⑰ 出 願 平2(1990)5月28日

⑱ 発 明 者 田 中 孝 生 大阪府大阪市南春日丘2丁目11番7号
⑱ 発 明 者 西 村 信 三 兵庫県川西市美山台3丁目1番59号
⑱ 発 明 者 朝 山 久 美 子 兵庫県神戸市倉石通1丁目2番25号
⑱ 発 明 者 砂 原 憲 之 京都府京都市西京区川島有栖川町86-2
⑲ 出 願 人 大日本製薬株式会社 大阪府大阪市中央区道修町2丁目6番8号
⑳ 代 理 人 弁理士 小島 一 晃

明 細 書

心臓疾患の診断のための試薬。

1. 発明の名称

抗脂肪酸結合性蛋白抗体およびその応用

2. 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は抗体および抗原や試薬に有用な試薬に
関する。

2. 特許請求の範囲

(1) ヒト心筋細胞由来の脂肪酸結合性蛋白(以下

下、hh-FABPという)を認識する抗hh-

FABP抗体。

② 抗体がモノクローナル抗体である請求項1記
載の抗体。

③ 抗体がポリクローナル抗体である請求項1記
載の抗体。

④ ①抗hh-FABP抗体、②抗hh-FABP抗体と
標識物質との結合物および③不標識キャリアー
と抗hh-FABP抗体との結合または標識物の内
の少なくとも1種または2種を検出要素とする
hh-FABPの免疫学的定量用試薬。

⑤ ①抗hh-FABP抗体、②抗hh-FABP抗体と
標識物質との結合物および③不標識キャリアー
と抗hh-FABP抗体との結合または標識物の内
の少なくとも1種または2種を検出要素とする

先行文献および解決課題

脂肪酸結合性蛋白(Fatty Acid Binding
Protein、以下、FABPという)は細胞質に存在す
る蛋白で、脂肪酸と結合する能力を持ち、脂肪酸
の細胞内代謝に関与している。FABPは動物の肝臓
や心筋組織、小腸などに分布している。

最近、ヒトの心筋細胞由来のFABP(以下、hh
-FABPという)が分離精製され、その構造解析も
行われている。Biochem. J., 252, 818 (1988)に
は、hh-FABPは132のアミノ酸から構成され、
分子量は14768であると報告されている。

Circulation Res., 65, 981 (1985)にはウサ
ギ心筋細胞由来のFABPを用いて作成したモノクロー
ナル抗体がhh-FABPと交差反応を示すことを
利用して、EIA法によりhh-FABPが測定でき

ると報告されている。しかし、本発明は、標準物質として hh-FABP ではなくウサギ心筋細胞由来の FABP を用いたことおよび用いた抗体の hh-FABP に対する交叉性がウサギ心筋細胞由来の FABP と同等でないことがあり、本発明での測定値は hh-FABP 量を正確に反映していない。

そこで本発明者らは種々検討し、より正確な免疫学的定量化を確立するとともに多数の患者の血液中の hh-FABP 量を定量化したところ、 hh-FABP が心筋梗塞のマーカーとして有用であることを見出し、本発明を完成した。

発明の構成

本発明は抗 hh-FABP 抗体およびこれを利用した hh-FABP の免疫学的定量化用試薬および心筋梗塞の診断のための試薬に関するものである。

本発明の抗体は、 hh-FABP を抗原とし、ヒト肝臓やヒト心筋細胞由来の FABP およびヒトイオグロビンとは實質的に交差反応をしないものである。本発明の抗体はポリクローナル抗体であってもよいしモノクローナル抗体であってもよい。より一

層性の抗体は、通常の方法により製造できる。ポリクローナル抗体は hh-FABP によってマウスやウサギ、ヤギ、ウマなどの動物を免疫することにより生産せしめることができるし、モノクローナル抗体はこのような免疫された動物の脾臓細胞とミエローマ細胞とをミルシュタインの方法により細胞融合させ、クローニングをなし、ハイブリドーマを選抜し、これを *in vivo* または *in vitro* で培養することにより製造できる。抗体なる hh-FABP はヒト心筋細胞から抽出・精製したり、細胞培養や遺伝子組換え技術により製造できる。

hh-FABP の免疫学的定量化には、①本発明の抗 hh-FABP 抗体、②抗 hh-FABP 抗体と標識物との結合物および③不溶化キャリアーと抗 hh-FABP 抗体の結合物または吸着物の内の少なくとも1種または2種の試薬が用いられる。

標識物としては、ペルオキシダーゼやβ-ガラ

クトングーゼ、アルカリホスファターゼの加水分解、 ^{125}I のような放射性物質、フルオロセインインソチオンアミンのような蛍光性物質さらにはスピニン化合物などが挙げられる。不溶性キャリアーとしては細胞細胞膜断片、ガラスやポリスチレンのビーズ、チューブ、マイクロプレートなどのEIAやRIAで用いられるものや凝集反応用のラテックス粒子などが挙げられる。本発明の抗体と標識物等との結合は、これらが有するカルボキシル基やアミノ基、S基、OH基などを利用して、結合剤の存在下または非存在下、常法に従って行われる。

hh-FABP の免疫学的定量化は、本発明の抗体の特異的な抗原結合能力を利用する方法であればいずれでもよく、例えば、EIA法やRIA法、ラテックス凝集反応法などの方法により実施できる。

これらの免疫学的定量化で用いられる試薬としては、例えば、結合EIA法では、

① 抗 hh-FABP 抗体

② ①の抗体に対する不溶化抗体（第2抗体）

③ 酵素標識抗体

④ 標識酵素に対する基質

⑤ 標準 hh-FABP 溶液

などが用いられ、サンドイッチEIA法では、

① 酵素標識抗 hh-FABP 抗体

② 不溶化抗 hh-FABP 抗体

③ 標識酵素に対する基質

④ 標準 hh-FABP 溶液

などが用いられ、ラテックス凝集反応法では、

① ラテックス粒子と抗 hh-FABP 抗体との結合または吸着物

② 標準 hh-FABP 溶液

などが用いられる。

血清や尿の加量ヒト体液中の hh-FABP レベルを検出することは心筋梗塞の診断に有用である。通常、 hh-FABP レベルは心筋梗塞の直後に、まず、血清レベルがピークに達し、その1～2時間後に尿中レベルがピークになるという変動パターンをとる。尿中レベルは血清レベルよりも高く、血清レベルの50～100倍にも達することがある。

血清中のh h - FABPのピークが出現する通り(時間)は、ヒトミオグロビンの場合とほぼ同じ。なお、ヒトミオグロビンは心筋梗塞の初期にそのピークが出現する点において評価されるマーカーであるが、心筋梗塞由来のものと骨格筋組織由来のものとを区別できず、診断は必ずしも正確ではないという欠点がある。ヒトの血清や尿中のh h - FABPの検出は、先に説明した免疫学定量法により行える。治療の緊急度によって、いずれの方法を選択するのかを決定すればよい。例えば、手術中における心筋梗塞の徴候をモニターするときはラテックス凝集反応法のような定量的あるいは定性の結果がすみやかに得られる方法が好適であり、心筋梗塞が疑われる患者、例えば胸痛を訴える患者に運動負荷を施し、h h - FABPレベルを検知するような、治療の緊急性よりも診断の正確性が求められるときは組合せ1A法などが選択される。

具体例

次に参考例および実施例を挙げて本発明を更に詳細に説明する。

緩衝液 I : 0.05M リン酸-ナトリウム緩衝液、pH 8.0

参考例 1 h h - FABP の調製

死後5時間後に採られた新鮮肝臓に關して得られたヒトの心筋組織250gを用いてh h - FABPを以下の方法で抽出・精製した。

心筋組織をナイフで切屑し、2500mlの緩衝液Bを加え、ポリロン型ホモゲナイザーで処理し、遠心(10万×g、30分)し上清を得る。上清を緩衝液Bで平衡化したセファクリルS-100HP(ファルマシア社)カラム(2.5×95cm)を用いて分離する。分子量1~2万の分画を緩衝液Cに対して十分透析後、緩衝液Cで平衡化したヒドロキシアパタイト(ナカライテス社)カラム(2.5×30cm)に添加し緩衝液Cで洗出する。最初に洗出される分画(粗製のh h - FABP)を得る。これは後記実施例1における免疫沈降として用いた。

粗製h h - FABP溶液を緩衝液Dに対して十分透析後、緩衝液Dで平衡化したDEAE-セファール(ファルマシア社)カラム(1×50cm)に添

なわ、以下で略記号をもって表わされる緩衝液は次の組成からなるものである。

緩衝液A : 0.1M BSA-0.1M NaN₃-0.8M NaCl-0.01M リン酸緩衝液、pH 7.0

緩衝液B : 10M グリセロール-1mMEDTA-2mM 2-メルカプトエタノール-0.9M NaCl-20mM リン酸緩衝液、pH 7.6

緩衝液C : 10M グリセロール-1mMEDTA-2mM 2-メルカプトエタノール-20mM リン酸緩衝液、pH 7.4

緩衝液D : 10M グリセロール-1mMEDTA-2mM 2-メルカプトエタノール-15mM トリス-塩酸緩衝液、pH 8.4

緩衝液E : 0.1M リン酸緩衝液、pH 7.0

緩衝液F : 0.02M リン酸緩衝液、pH 7.0

緩衝液G : 1M 酢酸ナトリウム緩衝液、pH 4.0

緩衝液H : 0.8M NaCl-0.1M リン酸緩衝液、pH 7.4

加し十分透析後、吸着した蛋白を塩化カリの恒濃的緩衝液(0~150mM)を有する緩衝液Cを用いて洗出する。抽出される蛋白分画を280nmの吸光度で測定し、各ピークを電気泳動法により分析し、分子量が約16000の単一バンドを示す分画をh h - FABP溶液とした。

実施例 1 ポリクローマル抗体の調製

参考例1で得た粗製h h - FABP(2.6mg蛋白/mg)に生理食塩水を蛋白濃度が1mg/mlとなるように加え、更に等量のフロイント完全アジュバントを加えてF/O型エマルジョンを作成し、これをラットの尾根2カ所、背部皮下8ヶ所に0.1mlずつ注射する。2週間後に背部皮下5カ所に0.1mlずつ注射する。以後同様にして追加免疫を2週間毎に9回行う。最終免疫は、粗製h h - FABPを蛋白濃度が2mg/mlとなるように生理食塩水で希釈して溶液を等量のフロイント完全アジュバントを加えてF/O型エマルジョンを作成し、これをラットの背部皮下10ヶ所に0.1mlずつ注射することにより行う。その9日後に腹動脈より

全血を採取し、血清を分離する。血清を透析液Aで希釈したものを抗h-h-FABPモノクローナル抗体溶液とした。

実施例 2 モノクローナル抗体の調製

実施例1に準じてBALB/Cマウスを免疫し、その脾臓細胞を採取する。対数増殖期にあるマウスミエロマ細胞P3-X63-Ag8-01 (ATCCカタログ番号CRL-1587) の 5×10^5 個と抗体産生性脾臓細胞の 1×10^5 個を混合し、これを培養液Hで濃心(400×g、10分)の洗浄後、37℃に保温した0.5 mlのポリエチレングリコール1500-RPMI-1640培地(1:1)を徐々に加え、ゆっくり攪拌する。90秒後、37℃に保温した10 mlの細胞融合用血清培地(500 mlペグリンG、500 g/mlストレプトマイシン含有RPMI-1640培地)を同様にして加え、10分後、同培地10 mlを加えた後濃心(400×g、10分)し、上清を除去する。得られるペレットにHAT培地を加えて、常法により培養する。抗体価の高いハイブリドーマを選別し、腹腔移植法によりクロニングをなし、クロン

化ハイブリドーマを樹立する。なお、抗体価の検定は後記実施例3で調製したB-ガラクトシダーゼ標識h-h-FABPを用いて行った。クロン化ハイブリドーマを、予めプリスタン処理したBALB/Cマウスに移植し、目的のモノクローナル抗体を含有する腹水をを得る。

このモノクローナル抗体の性質は次のとおりである。

- ① h-h-FABPを認識する。
- ② ヒト肝臓由来のFABPと実質的に交差しない
- ③ イヌ心筋組織由来のFABPと実質的に交差しない
- ④ ヒトシオグロビンと実質的に交差しない
- ⑤ h-h-FABPおよび豚肝臓由来のh-h-FABPの両方に対して組合的に結合する

実施例 3 豚肝臓由来のh-h-FABPの調製

実施例1で調製した抗h-h-FABP(3.5 mg/g蛋白/ml) 0.2 mlと1 mlの緩衝液Bとの懸液に200 μgのm-MBSを含むウレタン 0.2 mlを加えて、室温で30分間攪拌する。これに10

mlの緩衝液Fを加え、YB-5型高速遠心(アイコン社)で遠心し、さらに同緩衝液Fの7 mlで2回洗浄遠心を行う。調製液1.5 mlに500 μgの大腸菌由来B-ガラクトシダーゼ(ペーリンガーマンハイム社)を含む緩衝液F 0.2 mlと細胞懸液0.2 mlの混液を加えて、室温で90分攪拌する。緩衝液Aで十分洗浄したセファロース 8 B(ファマシア社)カラム(1.5×700 cm)に上記反応液を装し、緩衝液Aで溶出し、2 mlずつ分画する。25-33番目の分画をブールし、これを緩衝液Aで500倍に希釈したものを豚肝臓由来のh-h-FABP溶液とした。

実施例 4 不活化第2抗体の調製

ワットパテルス プランタム ATCC 8910の細菌細胞懸液40 mlを水4 mlに懸濁し、十分に均一にした後に1 mlの抗ウサギIgGヤブ抗体(第2抗体)を加え、攪拌下、600 μlの緩衝液G、5%水溶性カルボウイール水溶液120 μlおよび25%グルタルアルデヒド10 μlを順次加え、室温で1時間攪拌する。反応液を濃心(1500×g、10

分)し、沈殿に5 mlの緩衝液Aを加えて濃心洗浄する。これを3回くり返し、0.5%の細胞懸液を含有する20 mlの緩衝液Aに懸濁する。

実施例 5 混合E/A法

抗体h-h-FABP溶液または抗体50 μlを試験管にとり、これに実施例1で得た抗h-h-FABPモノクローナル抗体溶液200 μlを加えて攪拌し、室温で15-20時間放置する。これに実施例3で得た豚肝臓由来のh-h-FABP溶液200 μlを加え、37℃で30分間放置する。次に実施例4で得た不活化第2抗体の懸濁液290 μlを加え37℃で30分間放置した後、0.8% NaCl溶液2 mlを加えて濃心(1500×g、10分)し、上清を除去する。この洗浄操作をさらに1回くり返す。沈殿に0.5 mlの緩衝液Aを加えて4マ-で洗浄して沈殿を完全に分散させ、37℃で5分間予熱し、これに100 μlの酵素基質溶液[0.3 mM 4-ノタルゲンペリフェーリル-D-ガラクトピラノシド-1 mM MgCl₂-0.04M リン酸緩衝液(pH 7.0)]を加えて37℃で放置する。90分後に酵素反応の止液(0.1 M

K₂HPO₄→NaOH緩衝液、pH 11) を加えて検出し、蛍光検出（励起波長 365 nm、蛍光波長 450 nm）を測定する。

第1図は本発明における定量的法である。

実施例 5 心筋梗塞患者の h h - FABP レベル

実施例 5 に従って、ある心筋梗塞患者の血中および尿中の h h - FABP レベルを測定し、第2図の結果を得た。なお、同一検体について、日本臨床化学会年会誌第26巻、88頁(1986)に記載の方法に従ってイオグロビンも測定した。第2図において「u-」とあるのは血清を検体とした場合であり、「u-」とあるのは尿を検体とした場合を示し、Mはイオグロビンも測定する。従って例えば、「u-h h - FABP」は尿中の h h - FABP を意味する。

第2図に示すように、この患者の場合には心筋梗塞の発作が起出してから約5時間後に s - h h - FABP がピークになり、その約5時間後に u - h h - FABP のピークが出現し、そして s - h h - FABP のピークは s - M のピークと一致している。

尿により尿量の程度を判定し、次表の結果を得た。なお、次表には同一検体について、実施例 5 の組合 E 1 A 法で測定した結果もあわせて掲載している。

第1表

検 体 (尿)	ラテックス凝集反応法 (凝集の程度)	組合 E 1 A 法 (n g / m l)
健康者 A	-	(検出されない)
健康者 B	-	(検出されない)
心筋梗塞患者 C	++	1059
心筋梗塞患者 D	+++	8278
心筋梗塞患者 E	+	211

前表に示すようにラテックス凝集反応法の定量的結果(凝集の程度)は、組合 E 1 A 法の定量結果と、ほぼ対応した。本発明は、尿試料における診断方法として有用であると考えられる。

4. 図面の簡単な説明

第1図は組合 E 1 A 法による h h - FABP の定量標準曲線であり、第2図は心筋梗塞患者における血中(s-)および尿中(u-)の h h - FABP

u - h h - FABP の濃度は s - h h - FABP の約 1/50 倍である。

実施例 7 ラテックス凝集反応法

(1) 抗体感作ラテックス懸濁液の調製

懸濁液 1 に懸濁した 10% カルボン酸変性ラテックス H0501 (直径 0.82 μm、日本合成ゴム製) 350 ml に 2.5 ml の水溶性カルボキシルドを含有水溶液 50 ml を添加し、室温で攪拌する。30分後、実施例 2 で得たマウス腹水(抗 h h - FABP の IgG - ノーナル抗体溶液) 100 ml を添加し室温で 30分攪拌する。攪拌後、沈澱を 5 ml の緩衝液 A で 3 回洗浄し、超音波処理によりラテックスを分散させ、緩衝液 A に懸濁し、1% の抗 h h - FABP センコーナル抗体感作ラテックス懸濁液を調製する。

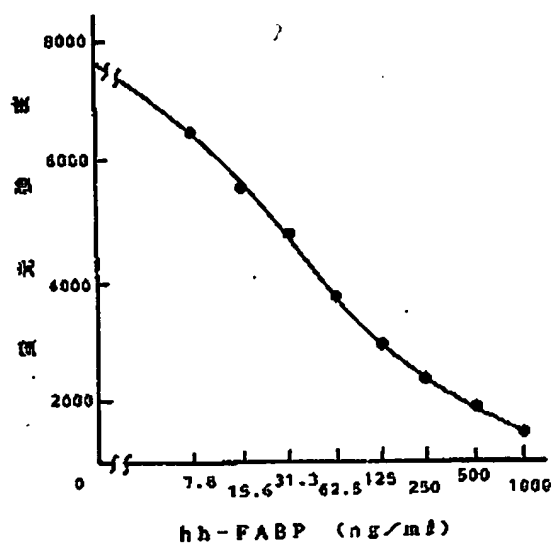
(2) 凝集反応

反応はラテックススライド法により行った。抗 h h - FABP の IgG - ノーナル抗体感作ラテックス懸濁液 20 μl を判定用スライドに滴下し、これに検体または標準の心筋梗塞患者の尿 20 μl を加え、よく混合し、室温における 5 分後のスライド凝集

および血中イオグロビン(s-Mb)の凝集パターンを示す。

特許出願人 大日本製薬株式会社
代 理 人 小 島 一 晃

第 1 圖



第 2 圖

